

PRODUCTION OF MICROSPHERE BY CROSSLINKING PROTEIN,

Publication number: JP2167222.(A)

Publication date: 1990-06-27

Inventor(s): JIYOSHIAANU AREKU; FURORANSU GODAIYU; JIAN KUROODO JIAMUURU; BURAHAMU SHIYURUUTO +

Applicant(s): CIRD +

Classification:

- **international:** A61K9/64; A61K8/04; A61K8/64; A61K8/65; A61K9/16; A61Q19/00; A61Q19/10; B01J13/04; A61K9/52; A61K8/04; A61K8/30; A61K9/16; A61Q19/00; A61Q19/10; B01J13/04; (IPC1-7): A61K9/64; B01J13/04

- **European:** A61K8/04H; A61K8/64; A61K8/64C; A61K8/65; A61K9/16H6H; A61Q19/00; A61Q19/10

Application number: JP19890210801 19890817

Priority number(s): FR19880010942 19880817

Also published as:

- FR2635459 (A1)
- IT1232917 (B)
- GB2224258 (A)
- ES2018638 (A6)
- DE3927073 (A1)

Abstract of JP 2167222 (A)

PURPOSE: To obtain a uniform protein spherule by adding a carbodiimide to an emulsion comprising an organic solvent phase containing a surfactant and an aqueous liquid phase containing a protein to activate cross-linking. **CONSTITUTION:** An emulsion comprising a continuous phase composed of a surfactant (e.g. sorbitan ester)-containing organic solvent, preferably a 5-10C aliphatic hydrocarbon or a 5-8C cyclic aliphatic hydrocarbon and a discontinuous phase composed of a hydrophilic liquid phase containing at least one protein is prepared. The emulsion is mixed with a carbodiimide, preferably 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and cross-linking is activated to form precipitate of spherule. The precipitate is separated and cleaned to give a protein spherule. When a mixture of an aqueous phase and an organic solvent (e.g. dimethylformamide) to be mixed with water is used as the discontinuous liquid phase, a water-insoluble product such as a capsulated medicine can be produced.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 平2-167222

⑫ Int. Cl.¹
A 61 K 9/64
B 01 J 13/04識別記号 庁内整理番号
D 7624-4C

⑬ 公開 平成2年(1990)6月27日

8317-4G B 01 J 13/02 A
審査請求 未請求 請求項の数 26 (全8頁)

⑭ 発明の名称 蛋白質の架橋による微小球体の製造方法、得られた微小球体及びその用途

⑮ 特願 平1-210801
⑯ 出願 平1(1989)8月17日

優先権主張 ⑰ 1988年8月17日 ⑱ フランス(FR) ⑲ 8810942

⑲ 発明者 ジョシアーヌ、アレク フランス国アンティープ06600、シュマン・ド・ラ・シュケット 300番 レ・ヴエルジエ・ド・ヴァル・コンスタンス

⑳ 出願人 サントル、アンテルナ フランス国ヴァルボーヌ06560、ソフィア・アンティボリ
シヨナル、ド・ルシエ
ルシュ、デルマトロジ
ツク㉑ 代理人 弁理士 中島直彦 外1名
最終頁に続く

明細書の添付(内容に変更なし)

明細書

1. 発明の名称

蛋白質の架橋による微小球体の製造方法、得られた微小球体及びその用途

2. 特許請求の範囲

(1)界面活性剤を添加した有機溶剤から成る連続相と少くとも1種の蛋白質を含有する親水性液体相から成る不連続相とから成る乳濁液をかきまぜによつて調整し、得られた乳濁液にカルボジイミドを添加して架橋を活性化しそして微小球体の沈殿物を得、そして前記沈殿物を分離し洗浄することを特徴とする、乳濁液中の架橋による蛋白質微小球体の製造方法。

(2)連続相に添加する界面活性剤がソルビタンエステルである前項(1)に記載の方法。

(3)不連続相が水性相である前項(1)または(2)に記載の方法。

(4)水性相が限定された時に緩衝されている前項(3)に記載の方法。

(5)不連続相が水と混合し得る有機溶剤と水性相

との混合物である前項(1)または(2)に記載の方法。

(6)有機溶剤がジメチルホルムアミドである前項(5)に記載の方法。

(7)カプセル化される製品が不連続相中に溶解されている前項(3)～(6)のいずれかに記載の方法。

(8)不連続相に還元剤を添加する前項(1)～(7)のいずれかに記載の方法。

(9)連続相を構成する溶剤が不連続相と混合しない溶剤である前項(1)～(8)のいずれかに記載の方法。

如連続相を構成する溶剤が脂肪族C₅～₁₀炭化水素または環式脂肪族C₅～₈炭化水素である前項(9)に記載の方法。

(10)連続相を構成する溶剤がシクロヘキサンである前項(9)に記載の方法。

(11)連続相を構成する溶剤がポリシロキサンである前項(9)に記載の方法。

(12)カルボジイミドが構造式



(この式で、RとR'は同一または異つていて、H、分枝状または非分枝状の脂肪族C₁～C₁₀基、

ヘテロ原子を含有するまたは含有していない環式脂肪族基、または芳香族基であり、これらの基は1つまたはそれ以上の酸性または堿基性置換基を持つてゐることができる)

で表わされる、前項(II)～(IV)のいずれかに記載の方法。

(II)カルボジイミドが1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドである前項(II)に記載の方法。

(III)活性化剤の他に触媒を導入する前項(II)～(IV)のいずれかに記載の方法。

(IV)触媒がスクシンイミドである前項(IV)に記載の方法。

(V)触媒がN-ヒドロキシスクシンイミドである前項(V)に記載の方法。

(VI)微小球体沈殿物を水または緩衝液の何れかで洗浄するか、1つの段階は水での少くとも1回の洗浄からなり、他の段階は無水の溶剤での洗浄からなる2段階で洗浄する前項(II)～(IV)のいずれかに記載の方法。

つ化合物を含有させるための、前項(IV)に記載の微小球体の使用。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微小球体の製造方法とかくして得られる微小球体の用途とに関する。

蛋白質は微小球体またはマイクロカプセルの製造のため広く使用されて來た。得られる微小球体またはマイクロカプセルは、特に薬剤中で、例えば徐放薬物の調製用または特別な器官への薬物導入のための賦形薬として用いられている。

微小球体またはマイクロカプセルの乳閡液中の接かけ方法は既知であり、それによれば蛋白質は2官能性反応物例えばグルタルアルデヒドまたはジクロリドにより接かけされる。これらの方針によれば、2官能性反応物は接かけされた蛋白質中に残留して構を形成する。この方法は蛋白質間に人工的スペーサーを導入すると云う不利な点を持つてゐる。

更に、カルボキシル基とアミノ基との間の反応はカルボジイミドおよび(または)スクシンイミ

ド無水の溶剤がエチルアルコールである前項(IV)に記載の方法。

(IV)少くとも1つの活性物質を微小球体中に組入れる前項(II)～(IV)のいずれかに記載の方法。

(V)微小球体への活性物質の組入れを、架橋工程の後で、前記微小球体を、組入れるべき活性物質を含有する溶液中に浸すことにより行う前項(IV)に記載の方法。

(VI)微小球体への活性物質の組入れを、微小球体を製造する際に達成せらる前項(IV)に記載の方法。

(VII)前項(II)～(IV)のいずれかに記載の方法により得られる、イソペプチド型の架橋により架橋された、1種またはそれ以上の蛋白質の微小球体。

(VIII)前項(IV)～(VI)のいずれかに記載の方法により得られる、イソペプチド型の架橋により架橋された、1種またはそれ以上の蛋白質の微小球体。

(IX)前項(IV)に記載の微小球体の、経口投与できる組成物中でのおよび乾燥した薬学的形態での、希釈剤または流動化剤としての使用。

(X)薬学的、化粧品学的または生物学的活性を持

ト誘導体によつて活性化されることが知られてゐる。特に、蛋白質のカルボキシル基と遊離アミノ基との反応による蛋白質の構かけを活性化させるために、これらの化合物が提案されてきた。この場合イソペプチド型の直接的な構がつくられる。この型の構かけは、スポンジまたはシート形のコラーゲンに基く、構かけされたマトリックス製造に関する国際出願第WO 85/04413号に記載されている。この方法によれば、作業は水性相中で行われ、コラーゲンをカルボジイミドおよび(または)2官能性スクシンイミゾルエスチルと接触させ、後、その混合物を高温で加熱してコラーゲンに基く構かけされたマトリックスを得る。フランス特許出願第A 2,280,352号は、ポリスチレンラテックスの不活性粒子を含有する緩衝されている水性媒質中、カルボジイミド存在の下で毒素蛋白質を組かけし、後、その混合物を加熱または空温に放置して、ポリスチレンラテックスに吸収された構かけ蛋白質を得た。

前記文書中には、乳閡液の形で反応を行つたも

のはないし、均一な微小球体を得ているものはない。

本発明によれば、活性化剤としてのカルボジイミド存在の下、乳化法により、イソペプチド型の直接的な橋の形成により、蛋白質から微小球体を調製できることが発見された。この微小球体の有利な点は、若し放出されると生物学的に有害または刺激性であるかもしれない反応物と蛋白質とを共有結合で結合させていないことである。従つて本発明によれば、必然的に蛋白質間にスペーサーが存在すると云う先行技術の不利益が回避される。

従つて、本発明は、連続相が界面活性剤が添加されている有機溶剤からなり、不連続相が少くとも1つの蛋白質を含有する親水性液体相からなる乳濁液を攪拌し乍ら調製し、カルボジイミドを前記乳濁液に添加して、蛋白質の橋かけを活性化し、微小球体の沈殿物を得、前記沈殿物を分離し、洗浄することを特徴とする、乳濁液中の橋かけによる蛋白質微小球体の製造方法に関する。

連続相に添加する界面活性剤はこの相に可溶で、

微小球体を形成させるのに用いられる蛋白質はイソペプチド型の橋を形成できるどんな蛋白質でもよい。また異なる蛋白質の混合物を用いることもできる。それには、人、動物または植物由来の蛋白質、例えば豚素、キャリヤー蛋白質（ヘモグロビンまたは血清アルブミン）、栄養蛋白質（オバルビンまたはカゼイン）、構造蛋白質（ケラチン、I, II, IIIまたはIV型のコラーゲンあるいはセラチン）、或る種の防衛または抗体蛋白質または免疫制御蛋白質および種々な他の蛋白質例えば毒素、膜受容体あるいはホルモンを挙げてもよい。更に特別には、血清アルブミンとリゾチームとが用いられる。これらの橋はイソペプチド型であり、蛋白質のNH₂基とCOOH基との反応により得られる。SH基またはOH基もまたCOOH基と橋を形成することができる。

連続相を構成する溶剤は不連続相と混合しない疏水性溶剤または疎水性溶剤の混合物である。特に、脂肪族C₈～C₁₀炭化水素または環式脂肪族C₃～C₄炭化水素、更に特別にはシクロヘキサンを

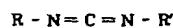
乳濁物を、その親水相が有機相に分散するように配向させる。この界面活性剤は、例えばソルビタノエステルであつてもよい。

第1の組様によれば、不連続液体相は水性相であり、その場合、蛋白質とカルボジイミドとは前記水性相に溶解している。その水性相は好ましくは限定された数の緩衝溶液である。カプセル化を所望する水溶性製品は、若し適当ならばこの水性相に溶解させる。活性素の溶解を可能にさせる溶解剤は、若し適当ならば添加してもよい。

第2の組様によれば、不連続液体相は水性相と水に混合する有機溶剤との混合物である。後者は好ましくはジメチルホルムアミド（DMF）である。事実、その高い溶解力によつて、DMFは水に不溶の分子を溶解させることができ、水に不溶の製品、例えば薬物のカプセル化を可能にする。こうしてカプセル化する製品をその有機溶剤を含有する混合物中に溶解させておくことができる。還元剤例えはジチオエリトリトールの不連続相への添加は収率を改善する。

用いる。また、ポリシロキサン例えはヘキサメチルジシロキサンまたは低粘度かまたは液体であるポリメチルシロキサンおよびポリジメチルシクロシロキサンも用い得る。

橋かけ反応活性化剤として用いられるカルボジイミドは構造式



（この式で、RとR'は同一または異り、H、分枝または分枝してない脂肪族C₁～C₁₀基、ヘテロ原子を含有していても、いなくてもよい環式脂肪族基または芳香族基である）

で表わされる。これらの基は反応副生成物の溶解を可能にする、1つまたはそれ以上の酸性または塩基性置換基を持つていることができる。更に特別には1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩化物、以下EDCI・HClと記す、を用いる。

好ましい組様によれば、活性化剤としてのカルボジイミドに加えて、触媒を用いることができる。この触媒はスクシンイミド、特別にはN-ヒドロ

特開平2-167222 (4)

キシスクシンイミドである。触媒は蛋白質と共に不連続相中に導入する。蛋白質の横かけをカルボジイミドとN-ヒドロキシスクシンイミドとの存在の下に行なう場合、その横かけ反応を第1図1に示すとくに示すことができる。この反応は明らかに、カルボジイミドは横の形成に関与していないことを示して、それは引張り簡単な洗浄により除去できる尿素導体に変わる。

その反応の終に微小球体の沈殿物が得られ、繰返し水で洗浄して副生成物例えばカルボジイミドから誘導される尿素を除去するか、あるいは、特にその微小球体がカプセル化されている薬物を含有し、その薬物を抽出したくない場合には適当な水性の緩衝液で洗浄する。

若し必要ならば、洗浄を2段階で行なうことが出来る。副生成物例えばカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドから誘導される尿素を除去するために行なう水での洗浄に加えて、不連続液体相と混合しない連続相を除去するために水での洗浄の前または後で、無水溶剤での洗浄、例え

蛋白質の微小球体に關し、その微小球体は例えば前記して定義した方法で得られる。

得られる微小球体の特性は使用蛋白質の型、不連続相の本性および使用した反応物の量に従つて異つてもよい。表1は微小球体が異なる機械的および物理化学的挙動を持つことができるることを示している。更に、選択した不連続相によつて、得られる微小球体は消化酵素により多かれ少なかれ劣化される。それ故、多かれ少なかれ生分解される微小球体が期待される通用の型に従つて得られてもよい。

表 1

パラメーター	水性不連続相			DMP20wt% 含有する不連続相
	アルブミン	リゾチーム	アルブミン	
EDCI.HCl量(1)*	300mg	600mg	1,370mg	200 mg
物理的外観	球状で強い	球状でこわ れやすい	球状で強い	
收率	25%	80%	-	90%
消化酵素	抵抗	-	-	
荷電	負	-	-	負

(1)* 使用蛋白質500mg当りの量
EDCI.HCl 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩

ばエチルアルコールでの洗浄を加えてもよい。

洗浄後得られる球体は乾燥、適当ならば凍結乾燥し、必要ならば還元媒中バーコール勾配によつて精製する。乾燥球体中に尿素が存在しないことはクロマトグラフィー分析により点検できる。

洗浄後得られる微小球体はその微小球体により固定したい物質の溶液と接触させることができ。固定に必要な接触時間の後、微小球体を洗浄し、乾燥する。

使用される反応物の量は作業条件に従つて変えることができる。次の例を挙げてもよい。

1. 水性不連続相を用いるアルブミンの場合：蛋白質500mg当りEDCI.HCl 200～600mg用いる。

2. 水中DMF20重量%で構成される不連続相を用いるアルブミンの場合：蛋白質500mg当りEDCI.HCl 200～600mg用いてもよい。

微小球体製造温度は一般に2～40°Cで、反応時間は変えることができ、少くとも5時間である。

本発明はまた新製品として、イソペプチド型の橋だけで横かけされている1つまたはそれ以上の

蛋白質の等電点に従い反応媒質のpHを選ぶことにより、正電荷または負電荷を持つ微小球体を得ることができる。こうして、本発明に従う微小球体はイオン性の製品例えば薬物をカプセル化または固定することができる。

得られる微小球体の直径は3μmから1μmまで変り得る。得られる微小球体の寸法は搅拌の速さと用いられる乳化システムとに左右される。超音波を用いることにより、10μm以下の直径を持つ微小球体を高い百分率で得られるかもしれない。また外部有機相中に適当な安定化剤を導入することにより小さい直径の微小球体を得ることができます。

本発明に従う微小球体は数多くの応用をもつ。

荷電を持たない微小球体はマッサージ用または皮膚清浄のため化粧瓶形態中に組入れることができる。この場合、微小球体ならびに生物学的本質の類似物例えば角膜細胞の完全に蛋白質的性質が利用される。荷電をもたない微小球体はまた乾燥薬剤形式中および経口投与することができる組成物中の希釈剤または流動化剤としても用いられる。

特開平2-167222 (5)

微小球体は薬学的、化粧品的または生物学的活性を持つている化合物を含有させるために用いることができる。特にそれは、薬物例えは消毒剤、抗真菌剤、抗菌剤、抗炎症剤、レチノイドまたはアントラノイド、化粧剤例えは頭髪染料または日光フィルターあるいは生活性物質用の賦形薬として役立てることができる。製品は微小球体製造時にカプセル化することもできるし、微小球体のイオン性を考慮して、カプセルにかつてある製品の浴液に微小球体を浸すことにより固定することもできる。

微小球体は不安定な薬物を保護できる。それは特別な皮膚の訴え例えは成るしたる様な条件の場合局所的に適用できる。

薬物を持つている微小球体はまた全身的に投与することもできる。

微小球体組成物においては、球体に生物学的(免疫学的または酵素的)性質を与える特別な蛋白質を含ませることもできる。

微小球体は着色剤を持つことができマイクアソ

次の処方で製造する。

倍かけられているアルブミン微小球体、 $\phi = 100 \mu\text{m}$	5.00 %
セチルステアリルアルコール	5.00 %
エチレンオキシド20モルを含有するポリオキシエチレン化セチルステアリルアルコール	0.70 %
エチレンオキシド1.2モルを含有する ポリオキシエチレン化	
セチルステアリルアルコール	0.30 %
セチルアルコール	1.50 %
グリセロールモノステアレート	2.00 %
ワセリン油	6.00 %
メチルパラ-ヒドロキシベンゾエート	0.08 %
プロピルパラ-ヒドロキシベンゾエート	0.07 %
シリコーン油	1.00 %
無菌水	77.35 %

皮膚の手入れに用いることができる滑らかなクリームを得る。微小球体は見分けられるが、その構造から欲しい感触である。

実施例3 キナクリンを持つ微小球体を含有するゼラチンカプセル

ア製品に用いられることができる。

以下に与えられる例は純粹に説明として、何等限定を意味することなく、本発明の理解を一層よくさせる。

実施例1 マッサージクリーム

次の处方で製造される。

倍かけされているアルブミン微小球体 $100 \mu\text{m} < \phi < 200 \mu\text{m}$	7.00 %
乳化ラノリンアルコール、ワックスおよび 炭化水素に基く精製油の混合物 "BDP"社より商品名 "Anhydrous Rucerin" で販売されるもの	37.00 %
メチルパラ-ヒドロキシベンゾエート	0.07 %
プロピルパラ-ヒドロキシベンゾエート	0.08 %
無菌水	55.85 %

均一な外観をもつ比較的濃厚なクリームを得る。通用の場合、クリームは脂様の肌合いを持ち、微小球体は皮膚上で見分けられ、マッサージ効果を増強する。

実施例2 皮膚清浄クリーム

キナクリンは通常経口的に投与される駆虫剤であり、抗マラリア剤である。本実施例に従い、キナクリンを徐放できるよう微小球体中に持たせて薬学的組成物を製造することを提案する。キナクリンを持つ微小球体は各微小球体500 μm を含有するゼラチンカプセルの形で提供される。

問題の微小球体の調製には、キナクリン塩酸塩50 μg 、ついでアルブミン500 μg を水2 ml に溶解する。それから全体を、Dow Corning社からFluid Dow Corning 344の名の下に販売され、Cyclomethiconeの名で(以下これを用いる)表はされるこの揮発性シリコーンに、商品名Span 85の下にICI社で販売されているソルビタントリオレエートを5重量%添加したポリジメチルシロキサン20 ml 中で、実施例4K配量の条件下に3分間乳化する。EDCI.HCl 600 μg を水1 ml に溶解し、前記の乳濁液を添加する。倍かけ工程を、攪拌しながら光を遮断して1.2時間続ける。倍かけ終了時、微小球体は強い黄色沈澱物の形で得られ、遠心分離し、水40 ml で洗浄し、凍結乾燥する。

特開平2-167222 (6)

顕微鏡の下で観察すると、凍結乾燥した製品はよく分離された形の微小球体で、実質的に、微小球体の外側には結晶を見ることができない。収率は使用蛋白質量に対し 7.5 重量% であり、微小球体中のキナクリンのカプセル化収率は 1 重量% である。

実施例 4

メチレン青を水性不連続相中のアルブミン微小球体中にカプセル化する。メチレン青 20 mg と血清アルブミン 500 mg とを水 2 ml 中に溶解し、全体を、Span 85 5 重量% 添加した Cyclomethicone 15 ml 中で乳化する。鋸型羽根をもつ攪拌機をつけ、それを 500 回転 / 分の速さで回転させている、50 ml のフラスコ中で乳濁液を製造する。3 分間攪拌後 EDCI·HCl 300 mg を含有する水性溶液 1 ml を添加する。この掛け工程を一定の攪拌の下、外部相の蒸発を避けながら 5 時間続ける。5 時間後、得られた微小球体は強い青色の沈殿物の形で、それを遠心分離し、エタノールで 1 回、次いで水で 2 回洗浄する。その洗浄はメチレン青の放出を制限

するよう非常に速に行う。それから微小球体を凍結乾燥する。カプセル化されたメチレン青の収率は、水性媒質中でその微小球体を磨碎した後、 $\lambda = 655.8 \text{ nm}$ の分光測定により測定される。カプセル化されたメチレン青の収率は微小球体の全重量に対し 1 重量% である。

実施例 5

メチレン青を無水不連続相中で血清アルブミン中に閉じ込める。メチレン青 (20 mg) と N-ヒドロキシスクシンイミド (10 mg) とをジメチルホルムアミド 2 ml 中に溶解する。それに血清アルブミン (500 mg) を添加し、超音波タンク中で 3 分間分散する。全体を実施例 4 と同じ作業条件で、Span 85 を 5 重量% 添加してある Cyclomethicone 15 ml 中に乳化する。EDCI·HCl 10 mg をジメチルホルムアミド 1 ml 中に溶解し、それからその乳濁液に導入する。掛け、洗浄、凍結乾燥を経てカプセル化されたメチレン青の収率の測定は実施例 4 におけると同様に行う。カプセル化されたメチレン青の収率は 0.5 の重量% である。

水中でのメチレン青放出についての曲線を実施例 4 と 5 との微小球体について比較した。第 2 図に示す曲線は、メチレン青の百分率放出量を分で表わした時間の関数として示している。曲線 1 は水中 EDCI·HCl の使用、曲線 2 はジメチルホルムアミド中 EDCI·HCl の使用に対応している。

メチレン青の放出が不連続水性相を用いて製造したアルブミン微小球体の場合非常に速らされていることが判かろう。メチレン青の半量は、無水相中で製造した微小球体の場合 2 分間で放出され、水性相中で製造された微小球体の場合 35 分間かかる放出されている。

両方の微小球体の場合、メチレン青の 90% 以上は 90 分後に放出されている。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図はカルボジイミドと N-ヒドロキシスクシンイミドの存在下における蛋白質の架橋反応を説明する概念的説明図であり、第 2 図は水中でのメチレン青放出曲線を示す概念的説明図である。

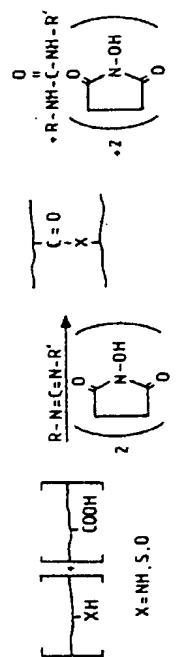


FIG. 1

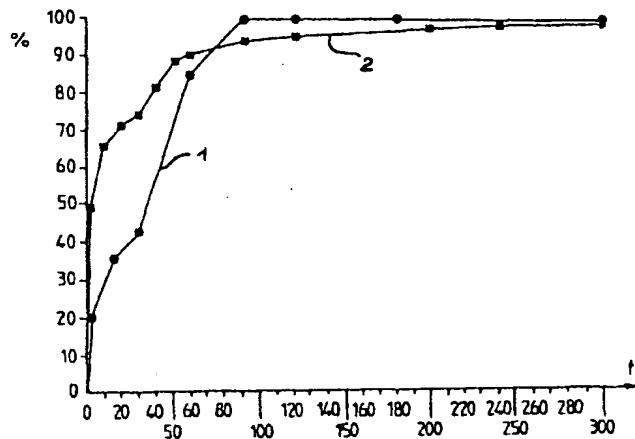


FIG. 2

第1頁の続き

- ②発明者 フランス、ゴダイユ フランス国パリ75014、リュー・アレ 41番
②発明者 ジアン・クロード、ジ フランス国ムーガン06250、アレー・ド・ラ・グランジュ
アムール 52番
②発明者 ブラハム、シユルート フランス国アンティープ06600、シュマン・ド・ヴァル・
ボスケ、アモー・ド・ヴァル・ボスケ、ヴィラ 35

特開平2-167222 (8)

特許出願補正登録 (方式)

平成 1年12月18日

特許庁長官殿

1. 事件の表示 平成1年特許第210801号

2. 発明の名稱 蛋白質の架橋による微小球体の製造
方法、得られた微小球体及びその用途

3. 補正をする者 事件との関係 特許出願人

サントル、アンテルナショナル、ド、ルシェルシル、
デルマトロジック

4. 代理人 東京都港区赤坂1丁目1番14号
渋谷東急ビル 電話584-0782
(5813)弁理士 中島宣彦



5. 補正命令の日付 平成1年11月13日
(平成1年11月28日発送)

6. 補正の対象 明細書の添付 (内容に変更なし)

7. 補正の内容 別紙のとおり



**Cited Document 3
(Partial Translation)**METHOD FOR PRODUCING MICROSPHERES BY CROSSLINKING PROTEINS, THE
5 OBTAINED MICROSPHERES, AND USE THEREOF**CLAIMS**

1. A method for producing protein microspheres by crosslinking in an emulsion,
10 comprising the steps of preparing an emulsion which comprises a continuous phase
comprising an organic solvent supplemented with a surfactant and a discontinuous phase
comprising a hydrophilic liquid phase containing at least one type of protein by stirring;
activating crosslinking by adding a carbodiimide to the obtained emulsion; obtaining a
precipitate of the microspheres; and separating and washing the aforementioned
15 precipitate.
2. The method of claim 1, wherein the surfactant added to the continuous phase is a
sorbitan ester.
- 20 3. The method of claim 1 or 2, wherein the discontinuous phase is an aqueous phase.
4. The method of claim 3, wherein the aqueous phase is buffered at a defined pH.
5. The method of claim 1 or 2, wherein the discontinuous phase is a mixture of an
25 aqueous phase and an organic solvent which may be water-miscible.
6. The method of claim 5, wherein the organic solvent is dimethylformamide.
7. The method of any one of claims 3 to 6, wherein a product to be encapsulated is
30 dissolved in the discontinuous phase.
8. The method of any one of claims 1 to 7, wherein a reducing agent is added to the
discontinuous phase.
- 35 9. The method of any one of claims 1 to 8, wherein a solvent constituting the continuous
phase is a solvent immiscible with the discontinuous phase.

10. The method of claim 9, wherein the solvent constituting the continuous phase is an aliphatic C₅₋₁₀ hydrocarbon, or a cycloaliphatic C₅₋₈ hydrocarbon.
- 5 11. The method of claim 10, wherein the solvent constituting the continuous phase is cyclohexane.
12. The method of claim 9, wherein the solvent constituting the continuous phase is polysiloxane.
- 10 13. The method of any one of claims 1 to 12, wherein the carbodiimide is represented by the structural formula:
- R-N=C=N-R'
- (wherein R and R' are the same or different and represent H, a branched or unbranched 15 aliphatic C_{1-C₁₀} group, a cycloaliphatic group containing or not containing a heteroatom, or an aromatic group, and these groups may have one or more acidic or basic substituents).
14. The method of claim 13, wherein the carbodiimide is 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide.
- 20 15. The method of any one of claims 1 to 14, wherein a catalyst is introduced in addition to an activator.
16. The method of claim 15, wherein the catalyst is a succinimide.
- 25 17. The method of claim 16, wherein the catalyst is N-hydroxysuccinimide.
18. The method of any one of claims 1 to 17, comprising washing the microsphere precipitate using either water or buffer, or washing the microsphere precipitate in two steps 30 wherein the first step comprises washing at least once with water, and the next step is washing with an anhydrous solvent.
19. The method of claim 18, wherein the anhydrous solvent is ethyl alcohol.
- 35 20. The method of any one of claims 1 to 19, wherein at least one active substance is incorporated into the microsphere.

21. The method of claim 20, wherein the incorporation of an active substance into the microsphere is carried out after the crosslinking process by soaking said microsphere into a solution containing the active substance to be incorporated.

5

22. The method of claim 20, wherein the incorporation of an active substance into the microsphere is accomplished when producing the microsphere.

10 23. A microsphere of one or more types of proteins forming isopeptide-type crosslinks, which is obtained by the method of any one of claims 1 to 19.

24. A microsphere of one or more types of proteins forming isopeptide-type crosslinks, which is obtained by the method of any one of claims 20 to 22.

15 25. Use of the microsphere of claim 23 as a diluent or a fluidization agent in a composition that can be administered orally and in a dry pharmaceutical form.

26. Use of the microsphere of claim 24 for inclusion of a compound having pharmaceutical, cosmetic, or biological activity.

20

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to methods for producing microspheres and uses of the obtained microspheres.

25

Proteins have been widely used for the production of microspheres or microcapsules. The obtained microspheres or microcapsules are being used particularly in pharmaceutical agents as excipients, for example, for introducing drugs into specific organs or for preparing controlled-release drugs.

30

Crosslinking methods for microspheres or microcapsules in an emulsion are known, and according to them, the protein is crosslinked using a bifunctional reactant such as glutaraldehyde or an acid dichloride. In these methods, the bifunctional reactant remains within the crosslinked proteins to form a bridge. These methods have the disadvantage that they introduce an artificial spacer between the proteins.

35

Furthermore, reactions between carboxyl groups and amino groups are known to be activated by carbodiimide and (or) succinimide derivatives. These compounds have been proposed particularly for activating crosslinking between proteins by reactions between the

carboxyl groups and free amino groups of proteins. In this case, a direct isopeptide-type bridge is formed. This type of linkage has been described in International Application No. WO 85/04413 relating to production of collagen-based crosslinked matrices in sponge or sheet form. In this method, the operation is done in the aqueous phase, collagen is made to come in contact with a carbodiimide and (or) a bifunctional succinimidyl ester, and then this mixture is heated to a high temperature to obtain the collagen-based crosslinked matrix. According to the French Patent Application No. A 2,280,352, a toxic protein was crosslinked in the presence of a carbodiimide in a buffered aqueous medium containing inactive particles of polystyrene latex, subsequently this mixture was heated or left to stand at room temperature to obtain a crosslinked protein absorbed on polystyrene latex.

In none the above-mentioned documents is the reaction performed in the form of an emulsion, and in none of them are homogeneous microspheres obtained.

According to the present description, the inventors discovered that microspheres can be prepared from proteins by formation of direct isopeptide-type bridge through an emulsification method in the presence of a carbodiimide as an activating agent. An advantage of such a microsphere is that the biologically harmful or stimulatory reactant to be released and the protein are not covalently bonded. Therefore, the present invention avoids the disadvantage present in the conventional technology which is the inevitable presence of spacers between the proteins.

Therefore, the present invention relates to methods for producing protein microspheres through crosslinking in an emulsion, comprising the steps of preparing an emulsion which comprises a continuous phase comprising an organic solvent supplemented with a surfactant and a discontinuous phase comprising a hydrophilic liquid phase containing at least one type of protein by stirring; activating crosslinking of proteins by adding a carbodiimide to the aforementioned emulsion; obtaining a precipitate of the microspheres; and separating and washing the aforementioned precipitate.

The surfactant added to the continuous phase is soluble in this phase and orients the emulsified substance so that the hydrophilic phase is dispersed in the organic phase. This surfactant may be, for example, a sorbitan ester.

According to a first embodiment, the discontinuous liquid phase is an aqueous phase, and in such case, the protein and carbodiimide are dissolved in the aqueous phase. The aqueous phase is preferably a buffer solution at a defined pH. A water-soluble product to be encapsulated is dissolved in this aqueous phase when appropriate. Solubilizers which enable solubilization of an active substance may be added when appropriate.

According to a second embodiment, the discontinuous liquid phase is a mixture of an aqueous phase and a water-miscible organic solvent. The latter is preferably dimethylformamide (DMF). In fact, DMF can solubilize molecules which are insoluble in

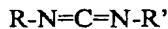
water through its high solvent power, and enables encapsulation of water-insoluble products such as drugs. This way, a product to be encapsulated can be dissolved in a mixture containing such an organic solvent. Addition of a reducing agent such as dithioerythritol to the discontinuous phase improves the yield.

5 **The protein used to form the microspheres may be any protein that can form peptide-type bridges. Mixtures of different proteins may also be used. Examples of these proteins include human-, animal-, or plant-derived proteins such as enzymes, carrier proteins (hemoglobin or serum albumin), nutrient proteins (ovalbumin or casein), structural proteins (keratin, collagen of type I, II, III or IV or gelatin), certain defense or antibody proteins or immunoregulatory proteins, and various other proteins such as toxins, membrane receptors or hormones. Especially, serum-albumin and lysozyme are used.**

10 These bridges are of the isopeptide type and are obtained by reaction of NH₂ groups with COOH groups of proteins. The SH or OH groups can also form bridges with the COOH groups.

15 The solvent which constitutes the continuous phase is a hydrophobic solvent or a mixture of hydrophobic solvents, which is immiscible with the discontinuous phase. In particular, an aliphatic C₅-C₁₀ hydrocarbon or a cycloaliphatic C₅-C₈ hydrocarbon is used, and more especially cyclohexane is used. Polysiloxanes, such as hexamethyldisiloxane or paper clay, or polymethylsiloxanes and polydimethylcyclosiloxanes which are fluid may also be used.

20 The carbodiimide used as a crosslinking reaction activator is represented by the structural formula:



25 (wherein, R and R' are identical or different and represent H, a branched or unbranched aliphatic C₁-C₁₀ group, a cycloaliphatic group which may or may not contain a heteroatom, or an aromatic group). These groups can carry one or more acidic or basic substituents which enable solubilization of the reaction by-products. Especially, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide chloride, hereinafter referred to as EDCI·HCl, is used.

30 According to a preferred embodiment, a catalyst may be used in addition to the carbodiimide serving as the activator. This catalyst is a succinimide, especially N-hydroxysuccinimide. The catalyst is introduced into the discontinuous phase together with the protein. When the crosslinking of proteins is carried out in the presence of a carbodiimide and N-hydroxysuccinimide, the crosslinking reaction can be depicted as shown in Figure 1. This reaction shows clearly that the carbodiimide does not participate in the bridge formation, and that it is converted to a urea derivative which can subsequently be removed by simple washing.

35 At the end of the reaction, a precipitate of microspheres is obtained, which can be

washed repeatedly with water to remove the by-products, for example the urea derived from the carbodiimide, or with an appropriate aqueous buffer, especially in the case where the microspheres contain an encapsulated medicament and one does not wish to extract this drug.

5

10 The diameter of the obtained microspheres may vary from 3 µm to 1 mm. The size of the obtained microspheres depends on the speed of stirring and on the emulsifying system used. By using sonication, a high percentage of microspheres having a diameter of 10 µm or less may be obtained. It is also possible to obtain microspheres of small diameter by introducing a suitable stabilizing agent into the external organic phase.

15 The microspheres according to the present invention have numerous applications.

The uncharged microspheres can be incorporated into cosmetic vehicles for massage or for skin cleansing. In this case, the genuinely protein-like character of the microspheres and substances having similar essential biological qualities such as corneal cells are utilized. The uncharged microspheres can also be used as diluents or fluidizing agents in dry pharmaceutical forms and in compositions which can be administered orally.

20 The microspheres can be used for containing compounds possessing pharmaceutical, cosmetic or biological activity. In particular, they can serve as an excipient for drugs such as antiseptics, antifungal agents, antibacterial agents, anti-inflammatory agents, retinoids or anthranoids, cosmetic agents such as hair dyes or sunlight filters, or biologically active substances. The products can be encapsulated at the time of producing the microspheres or can be fixed by soaking the microspheres in a solution of the capsulated product, considering the 25 ionic character of the microspheres.

25 The microspheres can protect unstable drugs. They can be applied topically in the case of particular skin complaints such as certain dripping conditions.

30 The microspheres loaded with drugs can also be administered systemically.

It is also possible to include in the microsphere composition, special proteins which impart biological (immunological or enzymatic) properties to the spheres.

The microspheres can be loaded with colorants and used in make-up products.

35 The Examples provided below further illustrate the present invention. However, these Examples are only provided for illustrations of the present invention, and the present invention should not be construed as being limited thereto.

EXAMPLE 1

Massage cream

5 The following prescription is used for the production:

Crosslinked albumin microspheres, 100 $\mu\text{m} < \phi < 200 \text{ Mm}$	7.00 g
Mixture of emulsifying lanolin alcohols, waxes, and refined oils based on hydrocarbons, sold under the trade name of "Anhydrous Rucerin" by the company "BDP"	37.00 g
Methyl <i>para</i> -hydroxybenzoate	0.07 g
Propyl <i>para</i> -hydroxybenzoate	0.08 g
Sterile water	55.85 g

A relatively thick cream having a homogeneous appearance was obtained. When applied, the cream had a greasy texture and the microspheres were discernible on the skin and enhanced massaging effects.

10

EXAMPLE 2

Skin cleansing cream

The following prescription is used for the production:

Crosslinked albumin microspheres, $\phi = 100 \mu\text{m}$	5.00 g
Cetyl stearyl alcohol	5.00 g
Polyoxyethyleneated cetyl stearyl alcohol containing 20 moles of ethylene oxide	0.70 g
Polyoxyethyleneated cetyl stearyl alcohol containing 12 moles of ethylene oxide	0.30 g
Cetyl alcohol	1.50 g
Glycerol monostearate	2.00 g
Vaseline oil	6.00 g
Methyl <i>para</i> -hydroxybenzoate	0.08 g
Propyl <i>para</i> -hydroxybenzoate	0.07 g
Silicone oil	1.00 g
Sterile water	77.35 g

15 A smooth cream which can be used for skin care was obtained. The microspheres were discernible but had a soft texture because of their structure.